

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 23 年 5 月 22 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500366

研究課題名（和文）リアノジン受容体の機能サブドメインを介する筋小胞体 Ca^{2+} 遊離の制御機構の解明研究課題名（英文）Study on regulation mechanisms of SR Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release by functional sub-domain of ryanodine receptor

研究代表者

上原 明 (UEHARA AKIRA)

福岡大学・医学部・准教授

研究者番号：60140745

研究成果の概要（和文）：

本研究は、心筋細胞の収縮に必須な筋小胞体から Ca^{2+} を遊離させるリアノジン受容体 RyR 分子に着目し、その細胞質ドメイン内に存在するリガンド結合部位の構造機能相関的解明を目指している。今回、野生型および変異体の RyR 組み替え体を HEK293 細胞に蛋白発現させ、RyR 分子から単一チャンネル電流を測定する実験手法を確立することが出来た。 Ca^{2+} 、ポリアミン、カルモジュリンなどのリガンド結合部位の責任アミノ酸領域が特定されつつある。

研究成果の概要（英文）：

The ryanodine receptors (RyR) release Ca^{2+} from SR in cardiac myocytes to trigger the muscle contraction. Our study aims at clarifying the structure-function relation of the cytoplasmic domain of the RyR molecule with ligand binding sites. We established experimental methods in which wild-type and mutant recombinant RyRs were expressed in HEK293 cells and single channel currents were recorded from the expressed RyR molecules. Identifying works regarding the amino acid regions of binding sites for ligands such as Ca^{2+} , polyamine, calmodulin are now in progress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2012 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2013 年度	1,000,000	300,000	1,000,000
2014 年度	1,000,000	300,000	1,000,000
総計	3,400,000	1,020,000	3,820,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経・筋肉生理学

キーワード：筋生理学

1. 研究開始当初の背景

RyR は、L 型 Ca^{2+} チャネルと共役し筋収縮に必須な Ca^{2+} 動員蛋白ながらも、分子自体の機能発揮の仕組みを探る構造機能連関の研究が大幅に立ち遅れている。L 型 Ca^{2+} チャネルと異なり、RyR 分子が全チャネルの中で最大サイズと扱いにくい事、細胞内膜系に発現するのでチャネル電流を測定するためのパッチ電極がアクセスできず分子を生化学的単離後に上手く再構成膜に埋め込む必要がある事に起因する。最近、この技術的問題が克服され、RyR でも機能サブドメイン変異体の作製と本機能解析を施せるようになった。しかし、RyR 変異体チャネルの電流解析実験は現在、国外の僅かのグループに留まる。米国で始まった電流解析実験は、興奮収縮連関の研究分野として今ホットな研究領域になっており、我が国でも急ぎ行うべきである。筆者らは高効率の電流記録が困難とされるリコンビナント RyR の電流記録に遂に成功したので、本実験を国内で先駆けて遂行した。

2. 研究の目的

RyR 分子は、数多くのリガンド結合部位即ち機能サブドメイン群からなる全チャネル最大の細胞質ドメインをもつ。各サブドメインは、チャネル活性修飾を介し Ca^{2+} 遊離を巧妙に調節する重要な機能単位であるが、その構造機能連関研究は遅れている。本研究は、L 型 Ca^{2+} チャネルからの流入 Ca^{2+} の結合部位と筆者が発見したポリアミン結合部位とを中心に、機能サブドメイン特定と構造機能連関解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 系統的な変異体作製法 点変異体導入体の作製は、コンベンショナルな方法の他にトランスポゾン法を用いた。後者は変異の導入効率が良く、今回の網羅的な変異体作製に優れている。

(2) 組み換え体 RyR の蛋白精製法 ウサギ骨格筋由来 RyR1 および心筋由来 RyR2 の cDNA を用いた。この目的 cDNA をゲノムの特定の部位に導入させるための FLP-InT-Rex システムを用い、HEK 細胞に導入した。RyR が大量発現すると Ca^{2+} イオン濃度上昇のため細胞毒性をもつので、それを避けるため増殖中は発現させない Doxycycline を用いた。RyR を HEK 細胞に蛋白発現させた後、発現細胞からマイクロゾームを調整し、CHAPS で可溶化したものを標本とした。

(3) 機能解析法その 1 野生型および変異体型の精製単離した RyR 分子を生物物理学的に人工脂質二重膜に融合させ、単一チャネル電流を記録する。モジュレータ物質を RyR の細胞質側と小胞体内腔側に分けて投与出来る利点を生かし、RyR 電流への効果を調べた。

(4) 機能解析法その 2 RyR 変異体 cDNA プラスミドを、L 型 Ca^{2+} チャネルの安定発現 HEK 細胞にトランスフェクションした。RyR1 または RyR2 の Ca^{2+} トランジェントを測定した。 Ca^{2+} やカフェインによる Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 遊離 (CICR) レスポンスを変異体毎に評価し、電流解析実験により得られた結果を再検討する。RYR1 における脱分極誘発性 Ca^{2+} 遊離 (DICR) は、高濃度 K^{+} 刺激により評価した。

4. 研究成果

今回、組み替えリアノジン受容体RyR分子を対象に、細胞質ドメイン上の機能的サブドメイン群の構造機能相関的研究に着手するための標本作成と実験手法の確立に成功した。ただ、RyRの分子サイズは50万と巨大である事と心筋型RyRと大腸菌との相性の悪さの2つから、標本作成の成功まで長い間の試行錯誤を強いられ、当初の実験計画予定より大幅に遅れた。しかし遅ればせながらも最近では、当初の目標であるRyR分子の細胞質内ドメイン内のリガンド結合部位の探索に着手することが出来た。目下、Ca²⁺、ポリアミン、カルモジュリン結合部位などのリガンド結合部位の構成アミノ酸領域が明らかにされつつある。

RyR は心筋や骨格筋の興奮収縮連関の要の分子であるにもかかわらず、国内では組み替え RyR の単一チャネル分子レベルの機能研究は我々以外には行われていない。欧米に早く追い付きたいと思っている。最近、我々が進めている本研究も軌道に乗ってきたので、目指す細胞質ドメイン内のリガンド結合部位は数年内にほぼ決定されると考えている。本研究を更に推進し、生理学的リガンドによるチャネル活性の調節機構の全容の解明に迫りたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① CLCA splicing isoform associated with adhesion through $\beta 1$ -integrin and its scaffolding protein Yamazaki J,

Okamura K, K Uehara, Hatta M J Biol Chem 288 No. 7, 4831-4843 (2013)

doi: 10.1074/jbc.M112.396481 査読有

② P2Y1, P2Y6, and P2Y12 receptors in rat splenic sinus endothelial cells: an immunohistochemical and ultrastructural study. Uehara K, Uehara A.

Histochem Cell Biol. 2011;136(5):557-67

doi: 10.1007/s00418-011-0859-2 査読有

③ Vimentin intermediate filaments: the central base in sinus endothelial cells of the rat spleen. Uehara K, Uehara A.

Anat Rec. 2010;293(12):2034-43.

doi: 10.1002/ar.21210 査読有

[学会発表] (計 8 件)

① 2013 年 3 月 27-30 日 高知

第 118 回日本解剖学会 脾洞内皮細胞がタガ線維に接着するための分子インテグリンの局在—インテグリン $\beta 1$ の関与— 上原 清子

② 2012 年 5 月 28-31 日 神戸

Joint Meeting of the 45th annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & the 64th annual meeting of the Japan Society for Cell Biology.

Immunohistochemical localization of integrins in rat splenic sinus endothelial cells 上原 清子

③ 2012 年 3 月 26-28 日 山梨

第 117 回日本解剖学会 脾洞内皮細胞とタガ線維の接着部位におけるインテグリンの局在 上原 清子

④2011年5月16-18日 福岡
第67回日本顕微鏡学会 ワークショップ発表：電子顕微鏡画像への第一歩 ～光学顕微鏡画像との連関～ 上原 清子

⑤ 2011年6月27-29日 札幌
第63回日本細胞生物学会
Immunohistochemical localization of P2Y receptors, PLC- β , and IP3R-1 in rat splenic sinus endothelial cells 上原 清子

⑥ 2011年3月28-30日 横浜（東北大震災のため開催中止により紙面発表）
第116回日本解剖学会・第88回日本生理学会 合同大会 脾洞内皮細胞におけるヌクレオチド受容体の局在 上原 清子

⑦ 2010年5月19-21日 大阪
第62回日本細胞生物学会 Vimentin filaments play the role as the central base in the rat splenic endothelial cells 上原 清子

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上原 明 (UEHARA AKIRA)
福岡大学・医学部・准教授
研究者番号：60140745

(2) 研究分担者

上原 清子 (UEHARA KIYOKO)
福岡大学・医学部・准教授
研究者番号：00084244